

Efeito antiedematogênico da planta *Vernonia scorpioides* frente ao veneno de *Bothrops fonsecai* e carragenina

Antiedematogenic effect of Vernonia scorpioides against Bothrops fonsecai venom and carrageenan

Danielle Monteiro Pereira¹; José Carlos Cogo²; Stella Regina Zamuner³

¹Graduada em Biologia – Univap São José dos Campos, SP – Brasil.

²Professor Doutor do programa de Engenharia Biomédica – Univap. São José dos Campos, SP – Brasil.

³Professor Doutor do programa em Ciências da Reabilitação – Uninove, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Stella Regina Zamuner

Av. Francisco Matarazzo, 612 – Água Branca

05001-100 – São Paulo, SP – Brasil.

stella.rz@uninove.br

Resumo

Introdução: Estudos farmacológicos têm demonstrado que os extratos de algumas plantas usadas na medicina tradicional possuem efeitos anti-inflamatórios, antivirais e propriedades antiofídicas. **Objetivo:** Avaliar o efeito antiedematogênico da planta *V. scorpioides* frente ao veneno *Bothrops fonsecai* (VBf) e da carragenina. **Métodos:** Dividiram-se ratos Wistar em seis grupos com quatro animais. O extrato hidroalcoólico de *V. scorpioides* (EHVs) foi colocado no bebedouro dos animais por cinco dias consecutivos. No quinto dia, aplicaram-se veneno (0,25 µg/pata) ou carragenina (500 µg/pata) nos ratos, conforme os grupos de tratamento, sendo avaliado o efeito edematogênico por pletismografia, em diferentes tempos. **Resultados:** A administração oral do EHV, em ratos, reduziu significativamente o efeito edematogênico, na segunda e terceira hora, após receberem o VBf, e na aplicação da carragenina a redução ocorreu na terceira até a sexta hora. **Conclusão:** A planta *V. scorpioides* pode ser uma alternativa, utilizada por via oral, para controlar inflamações que impliquem em formação de edema.

Descritores: *Bothrops*; Carragenina; Edema; *Vernonia*.

Abstract

Introduction: Pharmacological studies have shown that extracts of some plants used in traditional medicine have anti-inflammatory, anti-viral and anti-ophidic properties. **Objective:** To evaluate the anti-edematogenic effect of *V. scorpioides* against *Bothrops fonsecai* venom (VBF) and carrageenan. **Methods:** Wistar rats (n=24, 4 animals per group) were used. The hidroalcoholic extract of *V. scorpioides* (EHVs) was placed into bottle of the animals for five consecutive days. On the fifth day, the venom (0.25 mg / paw) or carrageenan (500 µg/paw) was injected in the rats, according to the treatment group, and the edematogenic effect was evaluated by plethysmography at different times. **Results:** Oral administration of EHV in rats significantly reduced the edematogenic effect at two and three hours after VBF administration and three until six hours after carrageenan injection. **Conclusion:** *V. scorpioides* can be an alternative, used orally, to control the inflammation that result in edema formation.

Key words: *Bothrops*; Carrageenan; Edema; *Vernonia*.

Introdução

Estudos farmacológicos demonstraram que os extratos e frações de algumas plantas usadas na medicina tradicional possuem propriedades anti-inflamatórias, antivirais e antifúngicas^{1, 2, 3}, constituindo uma alternativa para o tratamento de várias patologias.

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas são ainda um problema de saúde pública em regiões tropicais do mundo, sendo as serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos, na América Latina, pertencentes ao gênero *Bothrops* da família Viperidae⁴. No Brasil, aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos são provocados por animais desse gênero, sendo também considerados os mais agressivos⁵.

Os envenenamentos por acidente com serpentes botrópicas causam efeitos locais caracterizados por dor forte, presença de exsudato purulento, edema intenso, equimose com material sero-sanguinolento e mionecrose⁶. Atualmente, o tratamento utilizado na cura de um indivíduo que sofreu um acidente causado por serpente peçonhenta é a soroterapia, terapia altamente eficaz na neutralização de alterações sistêmicas em envenenamentos ofídicos; no entanto, a administração de antivenenos não neutraliza os efeitos locais, o que pode resultar em sequelas^{4, 7}. Por esse motivo, várias alternativas têm sido propostas para minimizar os efeitos locais causados pelos venenos botrópicos.

A fitoterapia tem sido utilizada como ferramenta para minimizar os efeitos locais causados por veneno de serpentes^{1, 2, 3}. Diferentes espécies de plantas estão sendo pesquisadas na busca da neutralização dos efeitos agudos dos venenos de diferentes espécies de serpente e de abelha^{3, 8, 9, 10, 11}. Uma dessas espécies é a *Vernonia scorpioides* (*V. scorpioides*), conhecida popularmente como “erva de São Simão”, pertence à família Compositae, Asteraceae¹². Essa planta apresenta propriedades antifúngicas¹³ e cicatrizantes¹⁴. Na terapêutica popular, ela é utilizada para tratar infecções do estômago (úlceras),

edemas provocados por traumatismos e agentes infecciosos, além disso, ela é usada também por ter efeito sedativo¹². Dessa maneira, neste estudo, tem-se como objetivo analisar o efeito anti-edematogênico da planta *Vernonia scorpioides* frente ao veneno de *Bothrops fonsecai* e ao agente flogístico carragenina.

Material e métodos

Condição ambiental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), campus Urbanova, na cidade de São José dos Campos, SP.

Veneno

O veneno de *Bothrops fonsecai* (VBf) foi obtido por meio da extração manual de espécimes, mantidas no viveiro do Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Univap. Após a extração o veneno foi liofilizado e mantido em dissecador e posteriormente em geladeira a 4 °C.

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200 g, fornecidos pelo Laboratório Anilab (Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas em temperatura local controlada (22 °C a 28 °C), monitorados diariamente recebendo água e ração *ad libitum*.

Protocolo de ética

Na condução científica, foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguidas as normas regulamentadas pela Lei 6.638/79 para a Prática Didático-Científica da Vivisseção

de Animais, após aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Univap, sob o protocolo aprovado nº A081/CEP/2007.

Protocolo de eutanásia

Os animais foram anestesiados com 5 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (analgésico) a 75 mg/kg de cloridrato de ketamina (anestésico) por via intraperitoneal e, posteriormente, mortos com administração intracardíaca de solução de KCl (cloreto de potássio) a 10%.

Preparo do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico da planta *V. scorpioides* (EHVs) foi preparado da seguinte maneira: coletaram-se *V. scorpioides* no viveiro de plantas medicinais do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Univap. Secaram-se as folhas à temperatura ambiente durante dez dias, posteriormente, sendo colocada numa estufa para esterilização e secagem por mais um período de dez dias. A desidratação total do material foi finalizada a uma temperatura controlada inferior a 40 °C. Após a dessecação total, o material foi moído em moinho elétrico de facas, e o pó obtido, pesado e acondicionado em frasco âmbar e mantido a temperatura ambiente em local seco, arejado e sem iluminação, por aproximadamente duas semanas.

O extrato fluido foi preparado em percolador de aço inoxidável com capacidade para 5000 ml, segundo o processo da Farmacopéia Brasileira (1959), utilizou-se o pó obtido acondicionando-se 1360 ml de álcool etílico 70%. A mistura permaneceu no percolador durante sete dias, período em que foi feita a primeira extração. Foi adicionada ao resíduo a mesma quantidade de álcool etílico (70%), sendo a mistura agitada por mais três dias, totalizando duas extrações. O extrato fluido foi armazenado em geladeira por dois dias, iniciando-se o processo de concentração por meio de um roto evaporador Buchi R-114, com temperatura inferior a 60 °C e, posteriormente, por uma bomba a vácuo.

Tratamentos

Os animais foram divididos em seis grupos de acordo com os tratamentos realizados, sendo o grupo 1: VBf; o 2: VBf + EHV; o 3: VBf + dexametasona; o 4: carragenina; o 5: carragenina + EHV e o 6: carragenina + dexametasona. Foi utilizado EHV (1 g/kg), diluído em 70 ml de água, para cada animal. Os grupos foram formados por quatro animais (n=4) cada. Foram colocados 70 ml de água ou extrato no bebedouro dos ratos, por cinco dias consecutivos¹⁵. Após o quinto dia, foi feita a injeção intramuscular no coxim plantar direito dos animais dos grupos 1, 2 e 3 com VBf (0,25 µg/pata) e nos ratos dos grupos 4, 5 e 6 com carragenina (500 µg/pata). A dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi injetada nos animais uma hora antes de ter sido aplicado o veneno no grupo 3 e a carragenina no grupo 6, que foi utilizada como controle anti-inflamatório. O volume total injetado na pata dos animais foi 50 µL, em todos os grupos. Na pata esquerda, utilizada como controle, administrou-se a mesma quantidade de solução salina a 0,9% também em todos os ratos.

Avaliação do edema de pata

O VBf (0,25 µg/pata) e a carragenina (500 µg/pata), dissolvidos em solução salina estéril, foram injetados no coxim plantar de uma das patas posteriores dos ratos componentes dos grupos 1, 2, 3 e 4, 5, 6, respectivamente. A pata contralateral (controle) de todos os animais recebeu igual volume de solução salina estéril. O volume das patas, medido até a articulação tíbio-társica, foi determinado antes da injeção do veneno ou da carragenina nos animais, de acordo com o grupo de tratamento, e nos seguintes intervalos de tempo: 15 e 30 min, 1, 2, 4 e 6 horas, após a injeção do veneno ou da carragenina, com o auxílio de um pletismógrafo, modelo 7140 Plethysmometer, Ugo Basile, Italy, de acordo com o método descrito por Van Arman et al.¹⁶. O edema foi expresso como a porcentagem de aumento do volume da pata tratada em relação à pata controle, em cada intervalo de tempo.

Análise histológica

Após a última medida do edema podal, o músculo plantar foi retirado e fixado em formol 10% por um período de 24 horas. A amostra foi lavada em água corrente por 15 minutos antes de iniciar o processo de desidratação com álcool etílico. Após a desidratação, foi realizada a inclusão definitiva em parafina. Cortes transversais com 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo Leica RC 2135, e montados sob lâmina para microscopia. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos do músculo foram analisados em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) Sistema Cool Pix 5400.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro-padrão (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi 0,05 ($p \leq 0,05$).

Resultados

Inibição do edema induzido pelo VBf

A administração do VBf (0,25 µg/pata), nos ratos, causou um aumento significativo e progressivo no volume podal dos animais. A ação do VBf apresentou pico máximo na terceira hora, com 39,29% de formação de edema e redução do volume da pata a partir desse momento (Figura 1).

O tratamento com o EHV causou uma redução do edema significativa de 65,5% e 46,8% na segunda e terceira hora, respectivamente, da injeção do veneno na pata dos animais. Nos tempos seguintes, não foram constatadas diferenças significativas para a eficácia do EHV contra o VBf, conforme mostra a Figura 1. A dexametasona causou uma diminuição expressiva na formação do edema da pata a partir da segunda até a quarta hora da aplicação do veneno (Figura 1).

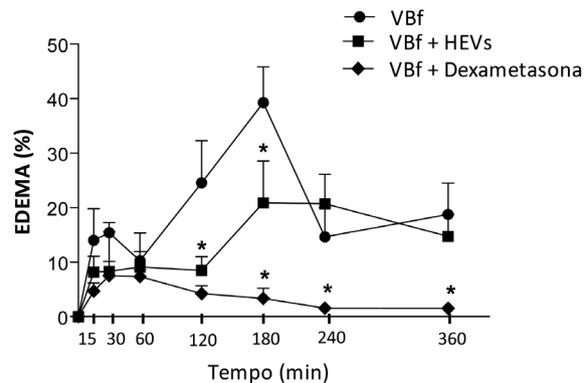


Figura 1: Efeito do EHV no edema induzido pelo VBf

Os animais foram tratados por cinco dias com EHV (1 g/kg). A dexametasona (1 mg/kg) foi administrada (i.p) uma hora antes da injeção do veneno (0,25 µg/pata). O edema foi avaliado por pletismografia após a injeção do veneno e expresso como aumento percentual do volume em relação à pata controle. Os dados representam a média ± E.P.M. de quatro animais. * $p < 0,05$ em relação ao veneno (ANOVA).

Inibição do edema induzido pela carragenina

O grupo que recebeu injeção de carragenina (500 µg/pata) teve o pico máximo de edema podal no tempo de quatro horas após essa aplicação, com 58,1% de aumento. Os animais tratados com o HEVs mostraram uma redução na formação de edema, nos tempos de 180, 240 e 360 minutos, apresentando respectivamente 53,9%, 40,1% e 68,6% de redução do edema podal. A dexametasona foi capaz de reduzir o edema induzido pela carragenina a partir do tempo de 120 min (Figura 2).

Análise histológica do músculo plantar

A análise qualitativa da pata controle mostra esse membro com aparência normal poligonal, com núcleos periféricos, não apresentando infiltrado de células inflamatórias e edema tecidual (Figura 3A). A análise histológica do músculo plantar dos ratos, após receberem injeção do VBf (Figura 3B) ou da carragenina (Figura 3C), conforme o grupo de tratamento, revela que

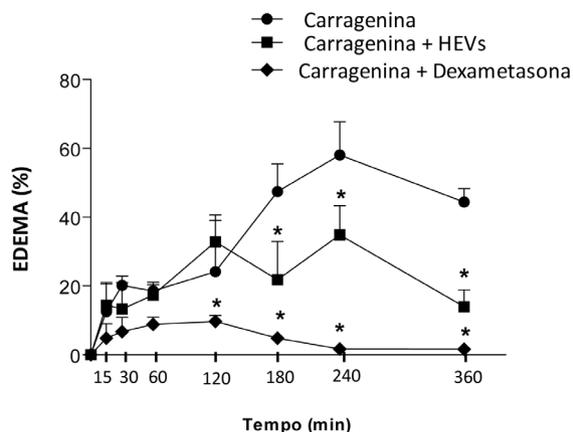


Figura 2: Efeito do EHVs no edema induzido pela carragenina

Os animais foram tratados por cinco dias com o extrato (1 g/kg). A dexametasona (1 mg/kg) foi administrada (i.p) uma hora antes da injeção da carragenina (500 µg/pata). O edema foi avaliado por pletismografia após a injeção da carragenina e expresso como aumento percentual do volume em relação à pata controle. Os dados representam a média ± E.P.M. de quatro animais. * $p < 0,05$ em relação à carragenina (ANOVA).

as fibras estão separadas, evidenciando a formação de edema. Observa-se uma melhora nos animais tratados com o EHVs; no entanto, ainda existe edema, mais visível nas lâminas dos animais injetados com o VBf que nos ratos em que se aplicou carragenina (Figura 3 D-E).

Discussão

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* causam um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas, representadas por edema, hemorragia e mionecrose, acompanhados de dor intensa^{6, 17}. Dentre tais efeitos, destaca-se o edema, evento mais importante da reação inflamatória causada pelo envenenamento por serpentes desse gênero e confirmado neste trabalho, após aplicação intraplantar do VBf.

A planta *V. scorpioides* é utilizada na terapêutica popular como sedativo, para tratar infecções no estômago (úlceras), edemas provocados por traumatismos e agentes infecciosos e para tratamento de outras doenças, que, segun-

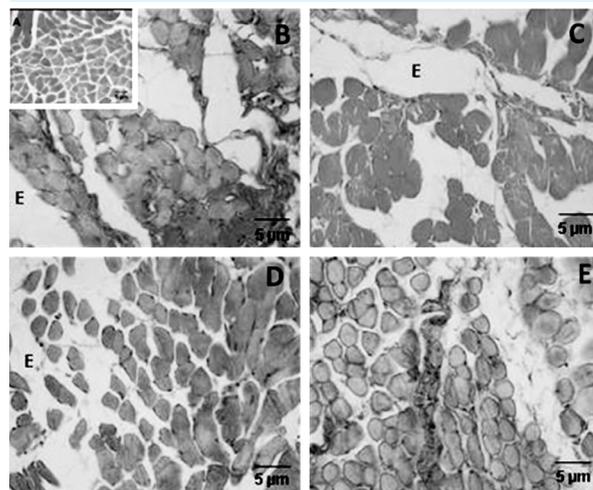


Figura 3: Demonstração histológica do músculo plantar de ratos (A) Músculo injetado com solução salina (Controle); (B) Músculo injetado com VBf; (C) Músculo injetado com carragenina; (D) Músculo injetado com VBf e tratado com EHVs; (E) Músculo injetado com carragenina e tratado com EHVs. Edema (E). Aumento de 40x.

do a tradição popular, podem ser amenizadas com seu uso por meio de infusões ou chás¹². Apesar do uso popular, os dados da literatura sobre a sua eficácia, quanto a sua atividade anti-inflamatória, são escassos.

Neste estudo, o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *V. scorpioides* (EHVs) administrado por via oral, na concentração de 1 g/kg diluído em 70 ml de água, ingerido durante cinco dias foi investigado em modelo experimental *in vivo*, avaliando-se o efeito anti-inflamatório do EHVs em relação ao processo inflamatório causado pelo veneno da serpente *Bothrops fonsecai* e o agente flogístico carragenina.

Os resultados demonstraram que o EHVs na concentração de 1 g/kg, diluído em 70 ml de água e ingerido durante cinco dias, foi capaz de reduzir significativamente o efeito edematogênico do veneno. Utilizando o mesmo modelo experimental e o veneno de *B. jararacussu*, Tieli et al.¹⁸ estudaram a ação do extrato metanoico da *Cordia verbenacea*, demonstrando efeito anti-edematogênico similar aos resultados encontrados neste trabalho. Ainda, Pereira et al.¹¹, usando o extrato etanólico da *B. portulacoides*, obtiveram

resultados semelhantes, tanto com o veneno de *B. jararacussu* quanto com suas miotoxinas isoladas. Nesse mesmo contexto, Borges et al.⁸ também evidenciaram a habilidade do extrato da *Casearia sylvestris* em inibir a atividade edematogênica do veneno e da miotoxina II de *Bothrops moojeni*. Já foi demonstrado que venenos botrópicos induzem a liberação de prostaglandinas, particularmente PGE₂, e que esses mediadores são fatores importantes para formação de edema^{19, 20}, assim, é possível sugerir que o efeito antiedematogênico do EHV_s diante do VBf ocorra por inibição da liberação de prostaglandinas, uma hipótese que precisa ser estudada futuramente.

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é o modelo experimental de inflamação aguda. A carragenina é o agente flogístico de escolha para os testes anti-inflamatórios, sendo conhecida por ser antigênica e desprovida de efeitos sistêmicos aparentes. Além disso, o modelo experimental exibe um alto grau de reprodutibilidade. O edema induzido por carragenina exibe uma resposta bifásica. A primeira fase é mediada pela liberação de serotonina, histamina e cininas, enquanto que a segunda fase é relacionada com a liberação de prostaglandina e substâncias de reação lenta com pico em três horas²¹. Os resultados neste estudo mostraram que o EHV_s inibiu o edema na segunda fase da inflamação induzida por carragenina, possivelmente pela inibição de prostaglandinas. Ainda, em trabalho realizado por Dreux²², a administração intraperitoneal do extrato de *V. scorpioides* em ratos apresentou efeito inibitório nos modelos experimentais de inflamação aguda de edema de pata induzido por carragenina e por histamina.

Conclusão

Neste estudo, demonstrou-se que o extrato hidroalcoólico da planta *V. scorpioides* possui propriedades anti-inflamatórias. Assim, a planta *V. scorpioides* pode vir a ser uma droga ativa

utilizada por via oral para controlar a inflamação que implique em formação de edema.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Valeparaibana de Ensino (FVE) pelo apoio financeiro.

Referências

1. Phillipson JD, Anderson LA. Ethnopharmacology and Western medicine. *J Ethnopharmacol.* 1989;25:61-72.
2. Martz W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon.* 1992;30:1131-42.
3. Mors WB, Nascimento MC, Pereira BM, Pereira NA. Plant natural products active against snake-bite – the molecular approach. *Phytochemical.* 2000;55:627-42.
4. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon.* 1998;36:823-46.
5. Barraviera B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: revisão. *JBM, São Paulo.* 1993;65(4):209-50.
6. Rosenfeld G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (eds). *Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates.* Academic Press, New York, London. 1971;2:346-81.
7. Zamuner SR, da Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon.* 2004;44:25971.
8. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp Biochem Physiol.* 2000;127:21-30.
9. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon.* 2001;39:1863-69.

10. Soares AM, Januário AH, Lourenço MV, Pereira AMS, Pereira PS. Neutralization effects of Brazilian plants against snake venoms. *Drugs of the Future*. 2004;29:1105-17.
11. Pereira IC, Barbosa AM, Salvador MJ, Soares AM, Ribeiro W, Cogo J.C.; Zamuner SR. Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins bthtx-I and II. *J. Venom Animals Toxin incl Trop Dis*. 2009;15(3):527-45.
12. Toigo L, Oliveira RF, Oliveira F, Marquez MOM. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial atividade antimicrobiana da erva-de-São-Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers *Rev Bras Farm*. 2004;85(2):49-55.
13. Freire MFI, Abreu HS, Cruz LCH, Freire RB. Inhibition of fungal growth extract of *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. *Ver. Microbial*. São Paulo. 1996;27:1-6.
14. Leite S N, Palhano S, Almeida MWB. Wound healing activity and systemic affects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. *Fitoterapia*. 2002;73:496-500.
15. Silva LCR, Nunes-Pinheiro DCS, Morais SM, Lopes-Neto BE, Santos GJL, Campello CC. Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de *Cocos nucifera* L. (Palmae) sobre a resposta inflamatória *in vivo*. *Rev Bras Pl Med, Botucatu*. 2009;11(4):429-34.
16. Van Arman CG, Begany J, Miller LM, Pless HH. Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan. *J Pharmacol Exp Ther*. 1965;150:328-34.
17. Gutierrez J M, Lomonte B. Local tissue damage induced by bothrops snake venoms. A review. *Memórias do Instituto Butantan*. 1989;51(4):211-23.
18. Ticli FK, Hage LIS, Cambraia RSC. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*. 2005;46:318-27.
19. Olivo RA, Teixeira CFP, Wallace JL, Gutiérrez JM, Zamuner SR. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*. 2007;49:670-7.
20. Moreira V, Gutiérrez JM, Amaral RB, Zamuner SR, Teixeira Cde F. Effects of bothrops asper snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes *in vivo*, and by isolated neutrophils and macrophages *in vitro*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;80(2-3):107-14.
21. Kale M, Misar AV, Dave V, Joshi M, Mujumdar AM. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2007;112(2):300-4.
22. Dreux EC. Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (Lam) Persoons em inflamação aguda [dissertação de mestrado em Ciências Biológicas]. Vale do Paraíba: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba; 2005.